

Pauliina Saarinen

# Entsyymianalytiikan automatisointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

23.5.2014



Tekijä(t) Otsikko	Pauliina Saarinen Entsyymianalytiikan automatisointi
Sivumäärä Aika	31 sivua + 4 liitettä 23.5.2014
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Biolääketiede
Ohjaaja(t)	Lehtori Mikko Halsas Laboratorioinsinööri Markus Kaarnakoski
<p>Työn tarkoituksena oli ottaa käyttöön ksylanaasiaktiivisuuden määritysmenetelmä Tecan Freedom EVO -nesteenkäsittelyrobotilla ja säätää laite vastaamaan käsintehtäviä analyysejä. Lisäksi testattiin pyökin ksylaaniin soveltuvuutta substraatiksi koivun ksylaaniin tilalle, sillä koivun ksylaaniin valmistus on lopetettu. Työssä määritettiin ksylanaasiaktiivisuudet BXU-ksylanaasimenetelmällä yhdeksällä eri mikrobikannalla tuotetuista entsyymipuolivalmisteista. Määritykset tehtiin rinnakkain sekä laitteella että manuaalisesti ja molemmilla substraateilla. Tuloksia käsiteltiin R-ohjelmalla ja Excelillä.</p> <p>Analyysin siirtäminen robotille pienensi oletetusti tulosten hajontaa ja poisti virhelähteitä. Analyysin tekeminen myös nopeutui, sillä yhdellä kertaa voi analysoida suuren määrän näytteitä verrattuna manuaalimenetelmään. Nesteenkäsittelyrobotin käyttöönoton myötä myös reagenssien kulutus pieneni ja pipetoinnin erityisesti laborantin kättä kuormittavat toistoliikkeet poistuivat. Analyysi voitiin siirtää robotille, sillä tulokset verrattuna manuaalimenetelmään olivat riittävän samanlaisia.</p> <p>Pyökin ksylaaniin todettiin soveltuvan käytettäväksi koivun ksylaaniin tilalla, joskin hajonta näytti olevan hieman suurempaa. Pyökin ksylaani erosi sekä väriltään että sameudeltaan koivun ksylaanista. Pyökkisubstraattia käytettäessä näytteiden ja näytenollien absorbanssit olivat suurempia kuin koivusubstraattia käytettäessä. Tilastolliset testit osoittivat tilastollisesti merkitsevän eron koivun ja pyökin ksylaaniin välillä, mutta käytännössä ero ei ollut merkitsevä, sillä tuloksissa sallitaan tietty vaihtelu.</p> <p>Nesteenkäsittelyrobottia on tulevaisuudessa tarkoitus käyttää muussakin entsyymianalytikassa.</p>	
Avainsanat	Ksylanaasi, nesteenkäsittelyrobotti, pyökin ksylaani, koivun ksylaani, pipetointi

Author(s) Title	Pauliina Saarinen Automating Enzyme Analytics
Number of Pages Date	31 pages + 5 appendices 23 May 2014
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Specialisation option	Biomedicine
Instructors	Mikko Halsas, Senior Lecturer Markus Kaarnakoski, Laboratory Engineer
<p>The aim of this thesis was to introduce the xylanase activity assay for Tecan Freedom EVO-liquid handling robot and to adapt the robot to correspond to the manual activity assay. A new substrate was also under testing: the purpose is to replace xylan from birch wood with xylan from beech wood, because manufacturing of the birch wood xylan has ended. Xylanase activities were measured according to BXU-xylanase method from nine different semi-finished products fermented with different microbe strains. Assays were carried out both manually and with the robot concurrently. Results were managed with Excel and the R-project.</p> <p>Commissioning of the robot decreased the dispersion of the results and removed sources of error as expected. Sample throughput increased, reagent consumption decreased and manually straining repetition of pipetting ended. The results with the robot compared to the manual results were similar enough to transfer the assay to the robot.</p> <p>It was found that the beech wood xylan could replace the birch wood xylan although the dispersion was slightly higher. The differences between birch and beech wood xylan were color and turbidity. Absorbances of the samples and blanks were higher with beech wood than birch. Statistical tests pointed out that there was a statistically significant difference between birch and beech wood xylan, but the difference was not significant in practice, because certain variation is allowed.</p> <p>There is intention to use the liquid handling robot for other enzyme analytics in the long term.</p>	
Keywords	Xylanase, liquid handling robot, xylan from beech wood, xylan from birch wood, pipetting

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Ksylanaasit	2
2.1	Ksylanaasin määritelmä	2
2.2	Leivontaksylanaasit	3
2.3	Rehuksylanaasit	3
2.4	Ksylanaasit muualla	3
3	Ksylanaasiaktiivisuuden määrittämenetelmät	4
3.1	DNS-menetelmä	4
3.2	Hydratsidi-menetelmä	5
3.3	Nelson-Somogyi-menetelmä	5
4	Nesteenkäsittelyrobotti	6
4.1	Laboratorioautomaatio	6
4.2	Tecan Freedom EVO	6
4.3	Pipetointi	8
4.3.1	Vapaa pipetointi (D)	9
4.3.2	Pipetointi nestepinnan tasolla (B)	9
4.3.3	Pipetointi kärjen liikuessa (A)	9
4.3.4	Yhtäaikainen pipetointi (C)	10
4.4	Sekoittuminen	10
5	KÄYTÄNNÖN OSUUS	11
5.1	Työn vaiheet	11
5.2	Substraatit	11
5.3	Näytteet	12
5.4	Nesteenkäsittelyrobotin ohjelmointi	13
5.5	Analyysitulokseen vaikuttavat tekijät	14
5.6	Havainnot	14
6	Matemaattiset tarkastelut	15
6.1	Hypoteesit	15
6.2	Keskiarvot	16



6.3	Suhteellinen keskihajonta	18
6.4	Lineaarinen mittausalue	19
6.5	Riippuvuus	20
6.6	Kaksisuuntainen varianssianalyysi (ANOVA)	23
6.7	Tukeyn testi	25
6.8	Parittainen t-testi	26
7	Yhteenveto	28
	Lähteet	30
	Liitteet	
	Liite 1. BXU-menetelmän kuvaus	
	Liite 2. R-ohjelman tulosteet: ANOVA	
	Liite 3. R-ohjelman tulosteet: Tukeyn testi	
	Liite 4. R-ohjelman tulosteet: Lineaarinen regressio	

## Lyhenteet

ANOVA      *Analysis of Variance*, Varianssianalyysi

BXU          *Birch xylanase unit*. Ksylanaasiyksikkö. 1 BXU = 1 nkat

DNS          Dinitrosalisyylihappo

RSD          *Relative Standard Deviation*, Suhteellinen keskihajonta.



## 1 Johdanto

Tässä opinnäytetyössä haluttiin siirtää manuaalinen entsyymiaktiivisuuden määritysmenetelmä nesteenkäsittelyrobotille ja lisäksi siirtyä käyttämään substraattina pyökin ksylaania koivun ksylaanin sijasta. Työn toimeksiantaja oli entsyymejä valmistava bioteknologia-alan yritys Roal Oy. Nesteenkäsittelyrobotti on erilaisiin nestepipetointeihin räätälöity laboratoriolaitte. Työssä testattiin BXU-ksylanaasimenetelmän (liitteessä 1) soveltuvuutta nesteenkäsittelyrobotille sekä säädettiin kyseinen menetelmä vastaamaan manuaalista suoritusta. Kyseinen nesteenkäsittelyrobotti on jo käytössä päivittäisessä proteiininanalytiikassa Roalin laadunvalvontalaboratoriossa.

Työssä analysoitiin yhdeksän ksylanaasientsyymipuolivalmisteen aktiivisuudet sekä käsin että Tecan Freedom EVO-nesteenkäsittelyrobotilla. Tecanin nesteenkäsittelyrobotti on pipetointiin kehitetty laite (Tecan 2013). Lisäksi analyysit tehtiin kahdella eri substraattilla, pyökillä ja koivulla, sillä koivun ksylaanin valmistus maailmalla on lopetettu ja tilalle tarvitaan vastaava substraatti. Työssä oli tarkoituksena tutkia, antaako laitteen tekemä analyysi samoja tuloksia kuin käsin tehtäessä ja onko koivun ja pyökin substraateilla eroa. Pyökin ksylaanin soveltuvuutta oli jo aiemmin testattu manuaalisesti muutamia kertoja suhteellisen hyvin tuloksin.

Analyysin automatisoinnilla on monia etuja: analyysin tekijästä (laborantista) johtuva virhe pienenee, jolloin tarkkuus paranee ja analyysissä käytettävien reagenssien määriä voidaan pienentää, mikä tuo rahallista hyötyä. Laitteella pystytään myös käsittelemään useampia näytteitä yhdellä kertaa ja käsin tehtävässä analyysissä esiintyvä pipetointien toistoliikkeen aiheuttama kuormitus vähenee huomattavasti.

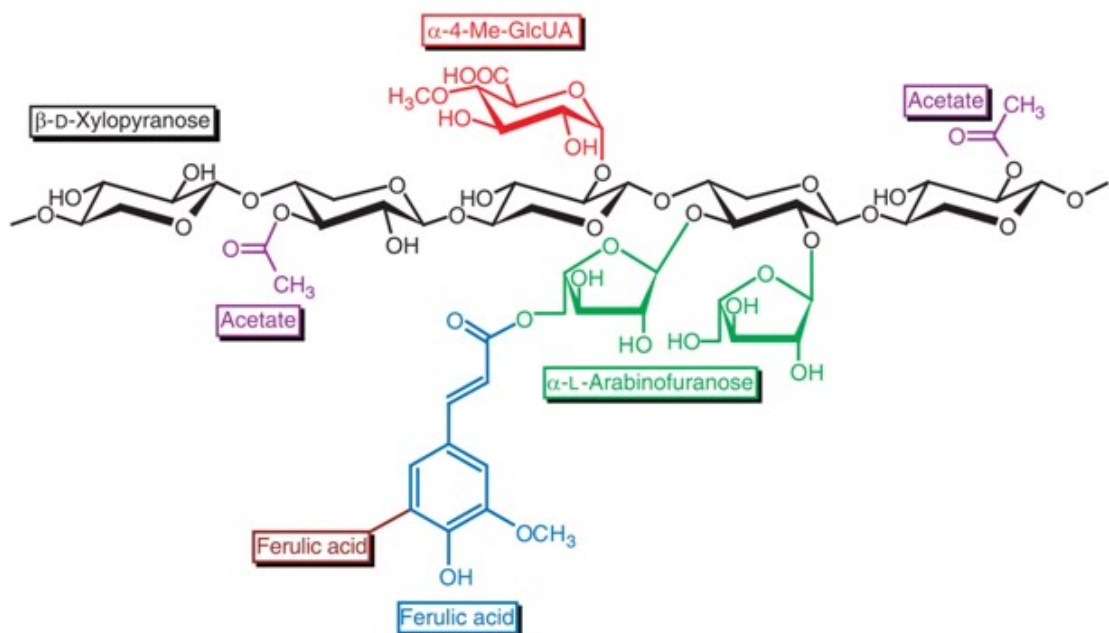
Laitetta on tarkoitus hyödyntää tulevaisuudessa myös muussa entsyymianalytiikassa.

## 2 Ksylanaasit

### 2.1 Ksylanaasin määritelmä

Selluloosa ja hemiselluloosa ovat kasvien soluseinän tärkeimmät polysakkaridit. Lehtipuiden ja viljojen pääasiallinen hemiselluloosa on ksylaani ja sen pilkkomiseen tarvitaan useita erilaisia hydrolyyttisiä entsyymejä. (IUPAC 1987.) Ksylaani on heteropolymeeri, joka koostuu toistuvasta  $\beta$ -1,4-sitoutuneesta ksyloosi-pääketjusta, josta haarautuu muun muassa asetyyli-, arabinofuranosyyli- ja metyyli-glukuronyyliryhmiä (kuva 1). (Enzymatic deconstruction of xylan 2013).

Ksylanaasi viittaa entsyymeihin, jotka pystyvät hydrolysoimaan 1,4- $\beta$ -D-ksylopyranosyyli-sidoksia. Ksylanaasit eli endo- $\beta$ -1-4-ksylanaasit pilkkovat ksylaanin pääketjua pienemmiksi oligosakkarideiksi. Tämän tyyppisille D-ksylanaaseille on annettu numerot (EC 3.2.1.8) Kansainvälisen Biokemian Unionin Entsyymikomission sääntöjen mukaisesti. (IUPAC 1987.)



Kuva 1. Ksylaanin rakennekuva. (Enzymatic deconstruction of xylan 2013).



## 2.2 Leivontaksylanaasit

Leivonnassa käytettävät ksylanaasit muuttavat taikinan liukenemattomat hemiselluloosat liukoisiksi. Esimerkiksi endoksylanaasit pilkkovat ksylanin pääketjun arabinoksytaanit ja vapauttavat vettä poistavia arabinoksytaaneja sekä vähentävät niiden molekyylimassaa. Ksylanaseiden avulla taikinasta saadaan lujempaa, kuohkeampaa ja vähemmän tahmeaa. Gluteenin rakenteen stabiilisuus paranee ja leivän mururakenteesta saadaan hienompaa. Valmiin leivän maku on voimakkaampi, rakenne kuohkeampi ja koostumus pehmeämpi sekä säilyvyysaika pidempi. Pieni osa ksylanaseista on kuitenkin spesifisiä liukoiselle arabinoksytaanille, minkä on osoitettu huonontavan leivän laatua: leivän pehmenemiseen vaikuttaa epäsuorasti arabinoksytaanin hajoaminen veden vapautuessa. (Baking xylanases 2013, Butt ym. 2008.)

Ksylanaseja käytetään leivonnassa yleensä yhdessä muiden entsyymien, kuten proteaasien ja amylaasien, kanssa, jolloin saadaan parhaat mahdolliset vaikutukset taikinaan. Entsyymeillä voidaan myös korvata leivonnassa erilaisia emulgointiaineita ja muita kemikaaleja, kuten bromaatti tai natriumbisulfiitti. (Baking xylanases 2013, Butt ym. 2008.)

## 2.3 Rehuksylanaasit

Rehuissa ksylanaseja käytetään muuttamaan kasvimassaa eläimen ruuansulatuksen kannalta edullisempaan muotoon. Liukenemattomat hemiselluloosat muuttuvat liukoisiksi ja ruokasulan viskositeetti alenee, jolloin se sulaa tehokkaammin. Entsyymien lisääminen rehuun parantaa eläimen toimintakykyä ja alentaa myös jätteen määrää. Ksylanaseit avaavat sekä viljan jyvän ytimen soluseiniä että aleuronikerrosta, jolloin niissä olevat ravinteet vapautuvat ruuansulatukseseen. Ytimessä on erityisen paljon proteiinia, joten sen sulaminen tehostuu. Samalla vapautuu ksylo-oligosakkarideja, joilla on positiivinen vaikutus suolistobakteereihin. (ABVista 2013.)

## 2.4 Ksylanaseit muualla

Paperiteollisuudessa ksylanaseja käytetään muun muassa paperin valkaisuun: kloorin käyttöä valkaisussa pyritään korvaamaan entsyymeillä. Lisäksi ksylanaseiden käyttö on

ympäristöystävällisempää. Ksylanaasit toimivat suurimmaksi osaksi paperimassan pintakuiduilla, joissa on uudelleen saostunutta ksylaania. Ksylanaasin aiheuttama hemiselluloosan hydrolyysi sisemmillä kuitukerroksilla voi myös edesauttaa valkaisua. (Buchert ym. 1994.)

Ksylanaaseja käytetään myös muun muassa mehujen ja viinien kirkastamisessa. Mehun ja viinin sameus sekä viskositeetti johtuvat pääasiassa hemiselluloosan, pektiinin ja ligniinin läsnäolosta. Lisäämällä soluseinää hajottavia entsyymejä, kuten ksy-lanaasia, voidaan kirkastamisprosessia parantaa. (Buchert ym. 1994.)

### 3 Ksylanaasiaktiivisuuden määritysmenetelmät

Ksylanaasiaktiivisuus määritetään yleensä pelkistävien sokereiden avulla. Substraattina käytetään ksylaania, jota saadaan muun muassa koivusta, pyökistä ja kaurasta. Reaktiossa entsyymin vapauttamat pelkistävät sokerit voidaan usein määrittää jonkin värireagenssin avulla fotometrisesti. (IUPAC 1987.)

Ksylanaasiaktiivisuusmäärittäykseen on melko vaikeaa löytää sopivaa substraattia, joka näyttäisi lineaarisuuden hydrolyysiajan ja hydrolyysissä syntyneiden pelkistävien sokereiden määrän välillä. Riippuen lähteestä, monet heteroksylaanit ovat liukoisia veteen tai puskureihin, joiden pH on 4,0–6,0. Substraatin vesiliukoisuus ei kuitenkaan ole tärkeää, kunhan entsyymiaktiivisuuden ja hydrolyysiajan välinen suhde on lineaarinen. Lineaarinen suhde entsyymiaktiivisuuden ja entsyymikonsentraation välillä on myös tärkeä, mutta tätä saattavat häiritä entsyymi-inhibiittorit, muun muassa fenolit: Fenoleja saattaa vapautua lignoselluloosasta tuotantohomeen kasvaessa. (IUPAC 1987.)

#### 3.1 DNS-menetelmä

DNS-reagenssi (3,5-dinitrosalisyylihappo) reagoi pelkistävien sokereiden kanssa muodostaen 3-amino-5-nitrosalisyylihappoa, kun aldehydyryhmät hapettuvat karboksyyli-ryhmiksi (kuva 2). Reaktiossa muodostuva oranssi väri absorboi valoa voimakkaasti aallonpituudella 540 nm. DNS toimii analyyssissa myös entsyymi-inhibiittorina, eli ent-

syymireaktio pysäytetään sillä inkubointiajan päätyttyä. DNS-analyysin yhteydessä tehdään standardisuora, jonka avulla aktiivisuustulokset lasketaan. (Miller 1959.)



Kuva 2. Dinitrosalisyylihapon pelkistymisreaktio. (Biocyclopedia 2014).

### 3.2 Hydratsidi-menetelmä

Useat happohydratsidit reagoivat pelkistävien hiilihydraattien kanssa alkalisissa liuoksissa muodostaen keltaisia anioneita. P-hydroksibenzoehappohydratsidi (PAHBAH) toimii DNS-reagenssin tavoin entsyymi-inhibiittorina, jolla entsyymireaktio voidaan pysäyttää analyysissä. Entsyymireaktiossa vapautuneet pelkistävät sokerit muodostavat PAHBAH:in kanssa keltaisen värin, kun tätä emäksistä liuosta lämmitetään. Muodostunut keltainen väri absorboi valoa aallonpituudella 412 nm. Kalsiumin ja erittäin korkeiden proteiinipitoisuuksien tiedetään olevan häiritseviä tekijöitä PAHBAH-analyyseissä. (Lever, M. 1972.)

### 3.3 Nelson-Somogyi-menetelmä

Menetelmä on yleinen määrittäessä pelkistäviä sokereita. Alkalinen kuparitartraatti ja pelkistävät sokerit muodostavat lämmitettäessä kuparioksidia. Kun siihen lisätään arsenomolybdeenihappoa, muodostuu sininen väri molybdeenihapon pelkistyessä ja absorbanssi voidaan mitata aallonpituudella 620 nm. (Sadasivam ym. 1996.)

## 4 Nesteenkäsittelyrobotti

### 4.1 Laboratorioautomaatio

Laboratorioautomaatio on laskennan, robotiikan, elektroniikan ja mekaanisen teknologian sovellus laboratorion tarpeisiin. Automaation avulla voidaan varastoida, valmistaa ja analysoida näytteitä, kontrolloida laitteita, analysoida ja varastoida dataa sekä käsitellä informaatiota. Automaatiota käytetään myös helpottamaan toistotyön aiheuttamaa kuormitusta ja sen avulla voidaan ottaa huomioon laboratorion ulkopuoliset toimijat, esimerkiksi prosessisuunnittelijat tai varaston hoitajat pääsevät helposti ja nopeasti tarkastelemaan tärkeää dataa. (Settle 1997:101-102.)

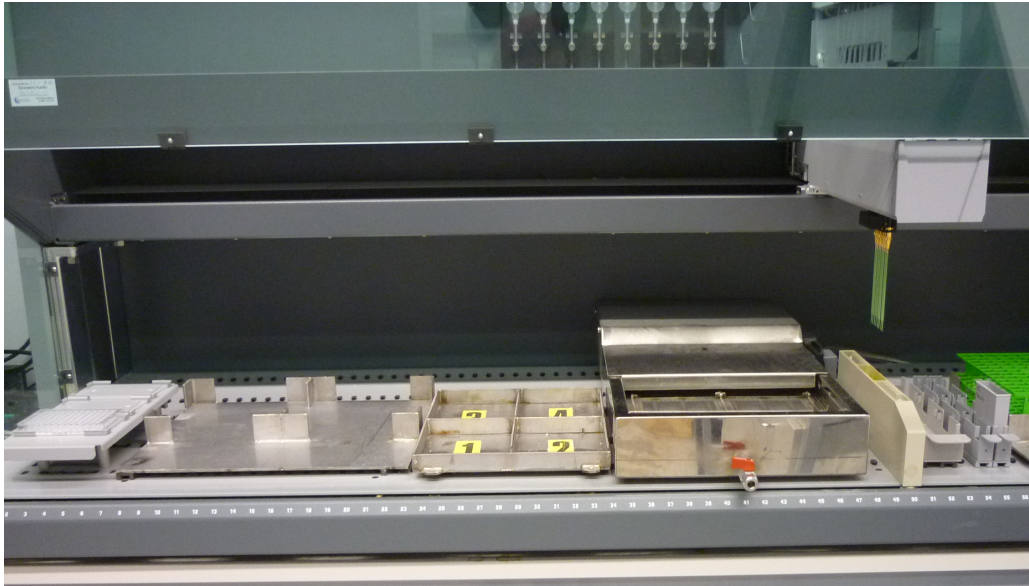
Automatisoimalla analyysin eri vaiheita voidaan pienentää analyysin tekijästä johtuvaa vaihtelua sekä virheitä. Laitteen tarkkuus ja toistettavuus ovat parempia kuin käsin tehtäessä, sillä laite toistaa analyysin vaiheet aina samalla tavalla. Automatisointi myös vapauttaa tekijän muihin tehtäviin analyysin ajaksi ja samalla analyysikerralla voidaan käsitellä suurempia näytemääriä. Automaattista laitetta käytettäessä pystytään usein myös pienentämään tarvittavia reagenssi- ja näytemääriä, mistä tulee taloudellista hyötyä. (Tecan 2001.)

Laboratorioautomaatiolla voidaan korvata työntekijää kuormittavia työvaiheita. Pipetointi on toistuva kuormittava liike. Työliikkeiden suuri toistuvuus on tutkimusten mukaan yhteydessä kyynärvarren, ranteen ja käden kiputilojen esiintyvyyteen. Se sisältää peukalon, ranteen ja sormien toistoliikkeitä sekä puristusotteen, joiden on todettu lisäävän rasitussairauksien riskiä. Rasitukselle altistuvat muun muassa sormien ojentajalihas, peukalon pitkä ja lyhyt koukistajalihas sekä hartialihhas. (Työterveyslaitos 2009.)

### 4.2 Tecan Freedom EVO

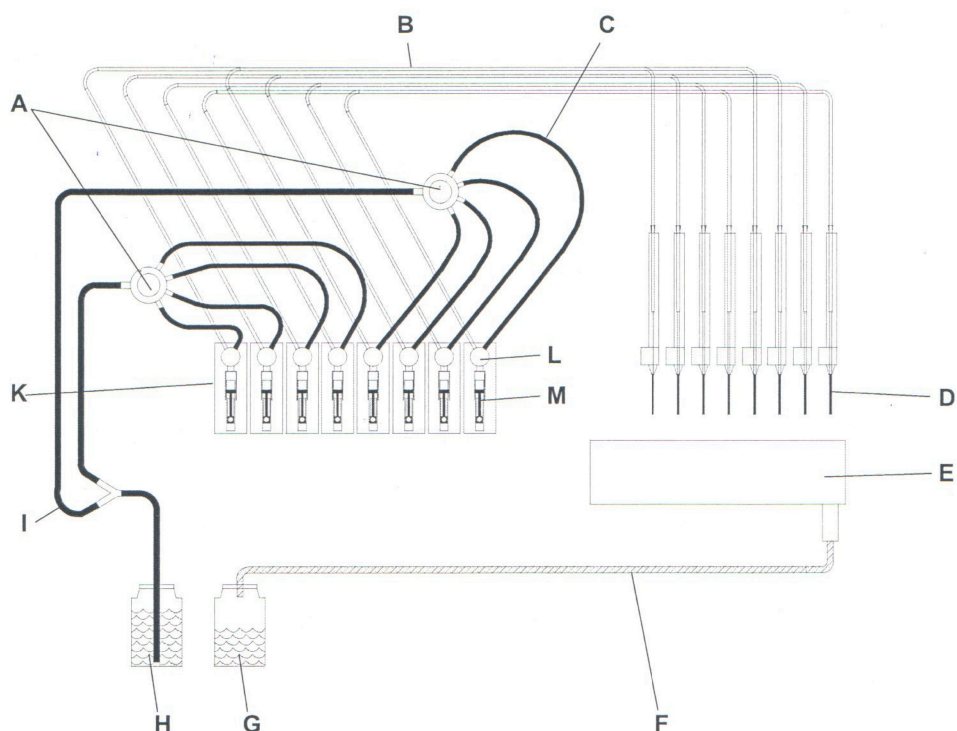
Tecan on sveitsiläinen laboratoriolaitevalmistaja, jonka Tecan Freedom EVO -sarjaan kuuluu nesteenkäsittelyrobotteja eri kokoisilla työpöydillä, joita voidaan muokata. Työpöydälle on mahdollista koota tarvittavia moduuleja käyttäjän tarpeiden mukaan, esimerkiksi reagenssiastioita, näytetelineitä ja vesihauteita. Robotissa on yksi tai useampi

LIHA (liquid handling arm) eli ”nesteenkäsittelykäsi”, jossa pipettien kärjet ovat kiinni. Pipettien kärjet voivat olla kiinteitä tai kertakäyttöisiä. (Tecan 2013.) Laitteeseen saa erikokoisia ruiskuja, jotka määrittävät pienimmän ja suurimman mahdollisen pipetoitavan nestemäärän (Tecan 2001). Robottia ohjataan tietokoneelta omalla ohjelmallaan. Robotin ohjaamiseksi tehdään tarvittavat ohjelmistot erillisellä ohjelmatyökalulla (Tecan 2013). Roalin laadunvalvontalaboratoriossa on käytössä kuvan 3 mukainen nesteenkäsittelyrobotti.



Kuva 3. Tecan Freedom EVO 200 -nesteenkäsittelyrobotti kahdeksalla ruiskulla ja kärjellä.

Nesteenkäsittelyrobotista voidaan eritellä 12 pääkomponenttia, jotka on esitelty kuvassa 4.



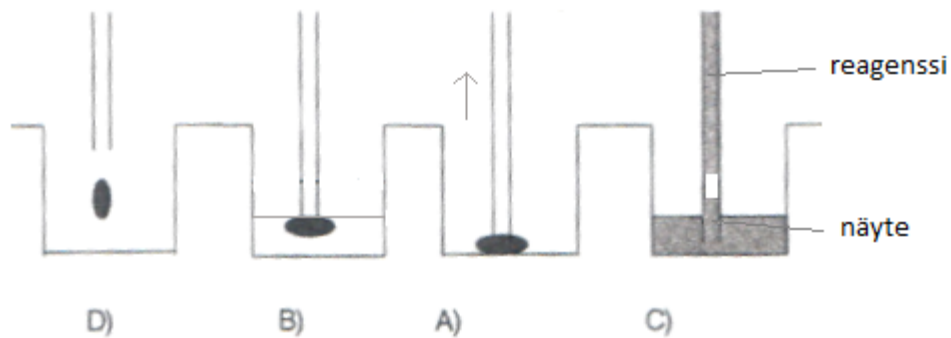
Kuva 4. Nesteenkäsittelyrobotin pääkomponentit: A) Jakajat 1-4 B) Pipetointiletku C) Yhdistävä letku D) Kärjet E) Pesuasema F) Jäteletku G) Jäteastia H) Järjestelmänestesäiliö I) Imuletku K) Laimentimet L) 3-tie venttiili M) Ruisku. (Tecan 2001).

### 4.3 Pipetointi

Pipetoinnilla tarkoitetaan määritellyn nestemäärän siirtoa paikasta toiseen pipetin avulla. Laitteen pipetointitarkkuuteen voidaan vaikuttaa monella tavalla ja pipetointitapa tulee valita käsiteltävän nesteen ominaisuuksien perusteella. Monet kvalitatiiviset analyysit eivät vaadi yhtä tarkkaa ja toistettavaa nesteenkäsittelyä kuin kvantitatiiviset analyysit ja tällöin useampia näytteitä voidaan käsitellä lyhyemmässä ajassa. (Tecan 2001.)

Nesteet voidaan aspiroida pipetteihin ja annostella määränpäähän yksi kerrallaan, mikä on tarkoin ja toistettavin, mutta samalla hitain tapa. Nopein tapa on aspiroida useat reagenssit yhdellä kertaa, jolloin pipetointikerrat vähenevät. Tällöin eri reagenssien väliin otetaan ilmarako, joka estää reagensseja sekoittumasta keskenään. Tämä vaikuttaa kuitenkin tarkkuuteen, joten tapaa voidaan käyttää vain sellaisessa nesteen siirrossa, joka ei suoraan vaikuta merkittävästi tuloksiin. Tarkkuus ja toistettavuus ovat

kuitenkin parempia kuin pipetoitaessa manuaalisesti. Pipetointitapoja on neljä erilaista (kuva 5). (Tecan 2001.)



Kuva 5. Pipetointitavat nestettä annosteltaessa. (Tecan 2001, muokattu)

#### 4.3.1 Vapaa pipetointi (D)

Vapaassa pipetoinnissa nestettä annosteltaessa pipetin kärki ei kosketa seinämää eikä pohjalla mahdollisesti jo valmiiksi olevaa nestettä. Kärjen etäisyyttä pohjasta on mahdollista säätää. Neste pipetointi on nopeaa ja toistettavaa, eikä pipetin kärki tai sen sisällä oleva neste pääse kontaminoitumaan. (Tecan 2001.)

#### 4.3.2 Pipetointi nestepinnan tasolla (B)

Neste voidaan annostella määränpäähensä koskettamalla samalla putkessa jo olevaa nestepintaa. Tämä tapa on tarkempi, mutta hitaampi, ja pipetin kärki sekä sisällä oleva liuos kontaminoituvat nestepinnan kosketuksesta. (Tecan 2001.)

#### 4.3.3 Pipetointi kärjen liikkeessä (A)

Edelliset pipetointitavat voidaan suorittaa niin, että nestettä annosteltaessa kärki liikkuu ylöspäin nestepinnan noustessa. Näin voidaan vähentää kontaminaatiota ja nesteen roiskumista. (Tecan 2001.)

#### 4.3.4 Yhtäaikainen pipetointi (C)

Sekä näyte että reagenssi voidaan pipetoida yhtä aikaa: ensin aspiroidaan reagenssi ja heti perään näyte ja molemmat annostellaan määränpäähän yhdellä kertaa. Tämä on nopea ja tarkka tapa, mutta sopii käytettäväksi vain, jos reagenssin lisäys näytteeseen ei ole riippuvainen ajasta. On myös huomioitava näytteen mahdollinen kontaminaatio reagenssista. Yhtäaikaista pipetointia voidaan hyödyntää muun muassa laimennetussa näytettä. (Tecan 2001.)

#### 4.4 Sekoittuminen

Nesteenkäsittelyrobotissa käytetään järjestelmänesteenä ionivaihdettua vettä. Järjestelmäneste toimii ikään kuin siirtäjäaineena, jotta nesteen liike letkuissa olisi sopiva koko matkalla aina pipetin kärjistä ruiskuihin asti. Vaarana on kuitenkin pipetoitavan nesteen sekoittuminen järjestelmänesteen kanssa. Tätä vähennetään käyttämällä ilmarakoja eli aspiroimalla sopiva määrä ilmaa ennen pipetoitavaa nestettä. (Tecan 2001.)

Ilma pysyy koossa nesteiden pintajännityksien avulla ja muodostuu kupla. Jos ilmakuplan tilavuus on liian suuri, nesteet pääsevät osittain sekoittumaa kuplan ympärille letkujen seinämään muodostunutta ohutta nestekerrosta pitkin. Tecanin testit ovat osoittaneet, että ilmaraon tilavuus olisi ihanteellisin 10 µl ja 30 µl välillä, kun käytetään standardiletkua, jonka sisähalkaisija on 1,5 mm. Minimi tilavuus ilmakuplalle lasketaan pallon tilavuuden kaavasta  $\frac{4\pi r^3}{3}$ . Yli 30 µl ilmarako vaikuttaa tarkkuuteen ja toistettavuuteen huonontaan niitä merkittävästi. Pipetoidessa reagenssit yksittäin ja käyttämällä oletusasetuksia, sekoittuminen järjestelmänesteen kanssa on maksimissaan 2,5 %. Jos käytetään ylimäärätilavuutta eli aspiroidaan tarvittavaa enemmän, sekoittuminen pienenee 2 %:iin. Jos lisäksi käytetään ”välitilavuutta”, eli pipetoitavan nesteen ja järjestelmänesteen väliin otetaan erottava ilma- ja nestekerros, saadaan laimentuminen järjestelmänesteeseen vähennettyä alle 0,5 %:iin. Laimenemisen vähentäminen vaatii suurempien nestemäärien käsittelyä, joten se hidastaa analyysien tekemistä. (Tecan 2001.)



## 5 KÄYTÄNNÖN OSUUS

### 5.1 Työn vaiheet

Ksylanaasiaktiivisuusmääritykset tehtiin Roalin menetelmäohjeen mukaisesti yrityksen laadunvalvontalaboratoriossa. BXU-ksylanaasimenetelmä perustuu substraatin, ksy-  
laanin, hydrolyysiin ksyanaasientsyymin toimiessa aktiivisesti. Kaikki testattavat entsyymipuolivalmisteet olivat jauhemaisia, ja määrityksiin valittiin tuoreimmat erät. Jokaisesta näytteestä tehtiin saman päivän aikana määritykset sekä käsin että laitteella ja kahdella eri substraatilla. Määritykset toistettiin jokaiselle puolivalmisteelle vähintään kolmena eri päivänä. Aktiivisuustulosten lisäksi tarkasteltiin menetelmän lineaarista mittausaluetta kummallakin substraatilla tekemällä laajan absorbanssialueen kattava laimennossarja yhdestä puolivalmisteesta. BXU-ksylanaasimenetelmän kuvaus liitteessä 1.

### 5.2 Substraatit

Testattavat substraatit olivat koivun ja pyökin ksylaani. Ksylaani (Poly(beta-D-(1,4)-ksylopyranoosi)) sisältää polysakkaridia, joka koostuu pääasiassa ksyloosista ja arabinooosista (Sigma 2013).

Kummastakin substraatista valmistettiin analyysiä varten käyttöliuokset samalla tavalla ja niitä säilytettiin joko pidempiä aikoja pakastettuna tai korkeintaan vuorokauden ajan jääkaapissa. Substraatit erosivat väriltään ja sameudeltaan hieman toisistaan: koivu oli sameampaa ja vaaleampaa kuin pyökki. Testauksen aikana huomattiin, että pyökin ksylaani antoi korkeampia absorbanssiarvoja, ja liuoksen tummempi väri oli selvästi havaittavissa (kuva 6). Absorbanssi nousi samalla myös näytenollassa, jolloin absorbanssierotus pysyi lähes samana kuin koivun substraattia käytettäessä. Substraatin vanhenemisen huomattiin myös vaikuttavan ainakin pyökin kohdalla absorbansseihin: vuorokauden vanha substraatti nosti absorbansseja selvästi. Substraatin säilyvyys vaatii vielä lisää testauksia.



Kuva 6. Näytteet ja standardit 96-kuoppalevyillä ennen mittausta. Yläpuolella käytetty koivun ja alapuolella pyökin ksylaania.

### 5.3 Näytteet

Testattaviksi näytteiksi valittiin yhdeksän kuivattua entsyymipuolivalmistetta tuoreimmista eristä. Entsyymit oli tuotettu muun muassa *Trichoderma*-, *Aspergillus*- ja *Bacillus*-kannoilla ja kuivattu spray-kuivurilla. Yhdestä puolivalmisteesta tehdään useampia valmiita tuotteita, joten lopputuotteita ei testattu erikseen. RXAP-puolivalmisteen ksy-lanaasiaktiivisuus määritetään yleensä toisella menetelmällä, mutta kyseistä entsyymikasvatusta seurataan BXU-menetelmällä.

Näytteet punnittiin mittapulloihin ja laimennettiin 0,05 M natriumsitraattipuskuriliuokseen, jonka pH oli 5,3. Jokaisesta näytteestä tehtiin kolme rinnakkaismääritystä analyysia kohden ja yhdestä punnituksesta saatiin aina yksi tulos. Näytteet analysoitiin satunnaisessa järjestyksessä ja yhden päivän aikana analysoitiin kolmea eri puolivalmistetta.

Näytteitä käsiteltäessä tuli ottaa huomioon mahdollinen altistuminen entsyymeille. Siksi pölyävät kuivat näytteet käsiteltiin vetokaapissa ja punnitus tapahtui jauhemaisille entsyymeille tarkoitettussa tilassa asianmukaisesti suojautuneena.

#### 5.4 Nesteenkäsittelyrobotin ohjelmointi

Ohjelmat robotille rakennettiin erillisellä Tecanin EvoWare- ohjelmatyökalulla. Ohjelmassa on valmiiksi luotuja erilaisia nesteluokkia, joissa on määritelty eri nesteille ominaisuuksia. Se helpottaa pipetointitavan valitsemista ja näin ohjelman tekoa, sillä kaikkia parametreja ei tarvitse itse luoda. Ohjelmaa tehtäessä ei tarvitse kirjoittaa koodia, vaan tarvittaville toiminnoille ja työpöydän moduuleille on omat kuvakkeensa, joissa niitä voi muokata.

Ohjelmia tehtiin kaksi: hydrolyysireaktion suorittamiseen sekä reaktion jälkeen näytteiden kuoppalevyille siirtoa varten. Hydrolyysireaktiosta tehtiin lisäksi toinen versio, jossa ei ole mukana standardeja. Sillä voi ajaa useampia näytteitä kerralla, kun standardisuora on tehty jo kertaalleen analyysipäivänä. Hydrolyysireaktion ohjelman rakenne:

1. Substraatin pipetointi kaikkiin putkiin. Substraatti lämpenee vähintään viisi minuuttia. Tämän aikana suoritetaan kohdat 2–4.
2. DNS-reagenssin pipetointi nollanäyte- ja standardiputkiin.
3. Näytelaimennoksen pipetointi nollanäyteputkiin.
4. Standardilaimennosten pipetointi standardiputkiin.
5. Näytelaimennosten pipetointi näyteputkiin (reaktion aloitus).
6. DNS-reagenssin pipetointi näyteputkiin (reaktion pysäytys).

Jokaisen pipetoinnin jälkeen kärjet huuhdellaan, jotta pipetointitarkkuus säilyy eivätkä eri reagenssit sekoitu keskenään. Lisäksi ohjelman alussa ja lopussa on erillinen pesu kärjille. Ohjelman kesto on kymmenestä minuutista puoleen tuntiin riippuen näytteiden määrästä. Päivän ensimmäiseen ajoon laitteella mahtuu enintään 32 näyteputkea, kun

standardisuora on mukana. Täydet ajot, 32 näyteputkea ja standardit, tai 48 näyteputkea, kestävät noin puolituntia. Noin kymmenessä minuutissa ajaa kahdeksan näyteputkea: substraatin temperointiaika on viisi minuuttia ja reaktioaika 5 minuuttia.

Ennen mittausta robotti siirtää näytteet 96-kuoppalevylle, josta niiden absorbanssit saadaan nopeasti mitattua kuoppalevylukijalla. Manuaalimenetelmässä jokainen näyte kaadetaan erikseen kyvetiin, mikä vie enemmän aikaa.

### 5.5 Analyysitulokseen vaikuttavat tekijät

Ksylanaasiaktiivisuusmäärittämisessä analyysituloksiin aiheuttavat vaihtelua eri työvaiheet, muun muassa näytteen punnitus, laimennus ja pipetointi, sekä työvaiheiden suorittaja. Näytteet punnitaan analyysivälikkeellä, johon liittyy oma mittausepävarmuutensa. Näytteen tulee olla myös hyvin sekoitettu ennen punnitsemista, jotta punnitus on edustava. Laimennusvaiheessa vaihtelua aiheuttavat sekä laborantti että laite: laimennus tapahtuu ensin mittapulloon, joka täytetään silmämääräisesti merkkiin, ja jatkolaimennus tehdään sähköisellä laimentimella. Pipetointivaiheen suorittaa joko laborantti tai nesteenkäsittelyrobotti, ja pipetointitarkkuutta kontrolloidaan vertailunäytteellä, jolle on määritetty ala- ja yläraja. Työvaiheiden lisäksi tuloksiin vaikuttavat käytettävät reagenssit sekä niiden mahdolliset poikkeavuudet.

### 5.6 Havaintoja

Kun nesteenkäsittelyrobotia käytettiin ksylanaasimäärittämisissä lähes päivittäin, huomattiin sen vaativan normaalia enemmän pesuja. Monien entsyymituotteiden kantoaineena käytettävä vehnä jauho saattaa tukkia pipettien ohuita kärkiä helposti: partikkelien jäädessä kärkiin ne keräävät muutakin likaa. Vesihuuhteluiden lisäksi käytetään emäksistä pesuliuosta sekä 70 % etanolia kärkien päivittäiseen pesuun. Liukenemattomia partikkeleita sisältäviä näytteitä laimennettaessa tulisikin odottaa partikkelien laskeutumista pohjalle tai sentrifugoida näyte, jotta partikkeleita ei pääsisi nesteenkäsittelyrobotille asti. Sentrifugointia on myös kokeiltu, mutta se ei juurikaan vaikuttanut analyysituloksiin. Lisäksi ylimääräinen työvaihe vie paljon aikaa. Päivittäisten pesujen lisäksi laitteella ajetaan puolitoistatuntinen pesuohjelma kerran viikossa, jonka jälkeen laitteisto jätetään etanoliin desinfioitumaan yön yli.

Jotkut tuotteet sisältävät lisäksi erästä amylaasientsyymiä, jonka huomattiin aiheuttavan hieman taustaa analyysissä. Näytenollien absorbanssit olivat selvästi korkeampia verrattuna reagenssinolnaan. Lisäksi kovin matala-aktiivisten tuotteiden analyysituloksissa havaittiin normaalia enemmän hajontaa laitteella analysoitaessa.

## 6 Matemaattiset tarkastelut

### 6.1 Hypoteesit

Oletuksena oli, että laite antaa samanlaisia tuloksia kuin manuaalimenetelmä, eli manuaalimenetelmän tuloksia käytettiin referenssiarvoina matemaattisessa tarkastelussa. Manuaalinen menetelmä on kuitenkin alttiimpi virheille kuin laite: manuaalimäärittämisessä vaihtelua tuloksiin aiheuttaa eniten analyysin tekijä. Pipetointikäsi vaihtelee tekijöiden välillä, mutta tätä pyritään kontrolloimaan mittaamalla vertailunäytettä analyysin yhteydessä. Vertailunäytteen tuloksen tulee osua tiettyjen arvojen väliin, jotta muut tulokset ovat vertailukelpoisia. Yleensä saman näytteen tuloksien välillä sallitaan alle 10 % ero. Laitteella pipetoinnista aiheutuva virhe on hyvin pieni, mikäli kaikki laitteen osat toimivat normaalisti.

Kokeen hypoteesit:

$H_0$ : Menetelmien välillä ei ole eroa (erotusten keskiarvo=0).

$H_1$ : Menetelmien keskiarvot poikkeavat toisistaan.

Jos ei tilastollisesti voida muuta todistaa, nollahypoteesin oletetaan olevan voimassa.

Hypoteesien voimassaoloon liittyvät johtopäätökset tehdään testisuureen arvojen perusteella ja siihen liittyy aina p-arvo eli merkitsevyystaso. P-arvo on hylkäämisvirheen todennäköisyys eli todennäköisyys sille, että  $H_0$  hylätään, vaikka se on totta. Mikäli tilastollisessa testissä saadaan hyvin pieni p-arvo, voidaan  $H_0$  hylätä, sillä riski tehdä virheellinen päätelmä on kovin pieni. Usein käytetty hylkäämisraja on 0,05 eli p-arvon ollessa sitä pienempi,  $H_0$  hylätään. Rajaa ei kuitenkaan ole mielekästä pitää ehdotmana ja tilanteesta riippuen voidaan ottaa suurempi riski. (Karjalainen 2010:219-221.) Lisäksi on muistettava tilastollisen merkitsevyyden ja käytännön merkitsevyyden ero

sekä näiden suhde. Tuloksissa voi olla tilastollisesti merkitsevä ero, mutta se ei välttämättä ole käytännön kannalta merkityksellinen ja päinvastoin. (Taavitsainen 2010.)

## 6.2 Keskiarvot

Manuaalisten tulosten sekä laitteen antamien tulosten keskiarvot ovat lähellä toisiaan, kuten taulukoista 1 ja 2 nähdään. Keskiarvoon vaikuttavat olennaisesti mahdolliset poikkeavat mittaustulokset. Varsinkin pienemmissä otoksissa yksikin selvästi poikkeava arvo ”siirtää” keskiarvoa poikkeavan arvon suuntaan. (Karjalainen 2010:88) Keskiarvojen erot laitteen ja manuaalimenetelmän välillä ovat kaikki alle 10 %, paitsi pyökin substraatilla ABJP -puolivalmisteen kohdalla. Poistamalla outlierit jää ero myös ABJP:n kohdalla alle 10 %. Keskiarvot on laskettu jokaiselle puolivalmisteelle summaamalla tulokset yhteen ja jakamalla summa tulosten lukumäärällä.

Taulukko 1. Kaikkien mittausten keskiarvot koivun substraatilla.

### Koivu

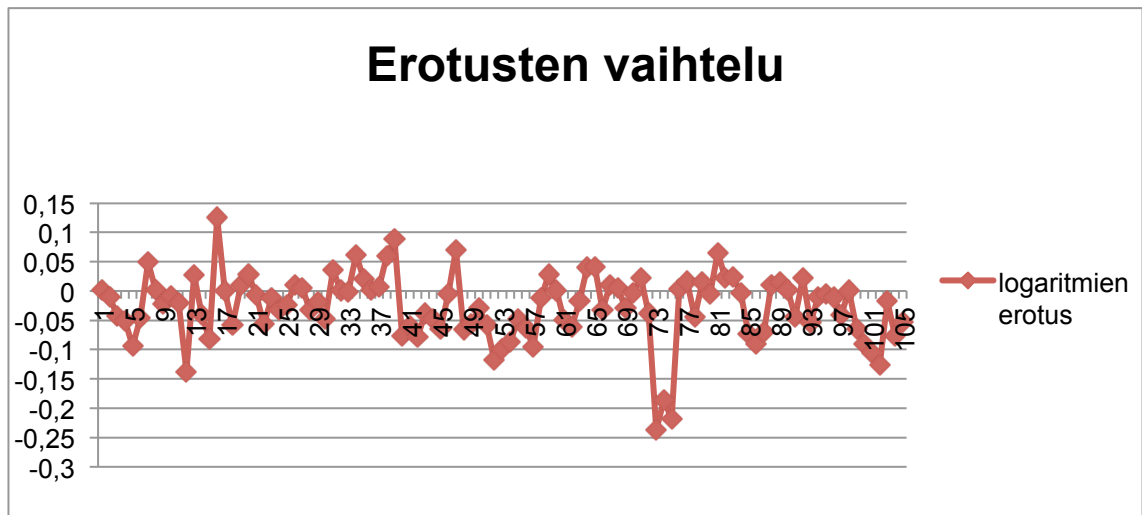
<b>Puolivalmiste</b>	<b>x(manuaali)</b>	<b>x(laite)</b>
ABJP	330378	329794
ACLP	94101	100664
AHHP	3841000	4025712
AHKP	5654408	5733290
XYL1	929861	898509
XYL2	5865355	5752371
RXAP	996284	1021302
RXKP	3555136	3367489
RXMP	1007738	1049369

Taulukko 2. Kaikkien mittausten keskiarvot pyökin substraatilla.

**Pyökki**

<b>Puolivalmiste</b>	<b>x(manuaali)</b>	<b>x(laite)</b>
ABJP	367486	327890
ACLP	113968	112338
AHHP	3904043	3707435
AHKP	5711405	5515360
XYL1	1066911	971971
XYL2	5831510	5698213
RXAP	1179443	1175547
RXKP	3875053	3514981
RXMP	1122841	1082694

Pyökkisubstraatin kohdalla näyttäisi, että laitteella saatujen tulosten keskiarvot olisivat aina hieman pienempiä kuin manuaalitulosten. Laitteella saadut tulokset ovat useammin hieman matalampia, mutta eivät aina. Alla olevassa kuvassa 7 on havainnollistettu tulosten vaihtelua. Erotus on laskettu vähentämällä laitteen tuloksen logaritmistä manuaalituloksen logaritmi. Tulokset ovat satunnaisessa järjestyksessä. Jos tulos on manuaalimenetelmällä pienempi, erotus on positiivinen, ja tuloksen ollessa suurempi kuin laitteella saatu, erotus on negatiivinen. Vaihtelua näyttää olevan nollan molemmin puolin eikä mitään systemaattista ole havaittavissa vaihtelussa. Myös edempänä kuva 13 havainnollistaa tulosten erotusten jakautumista pyökillä ja koivulla, ja siitä on nähtävissä, että keskimäärin tulokset ovat pienempiä laitteella kuin manuaalisesti pyökin kohdalla. Laitteen pipetointitarkkuutta voitaisiin säätää aiemmin todetuilla tavoilla, muun muassa ilmaraoilla.



Kuva 7. Peräkkäisten mittaustulosten logaritmien erotusten (laitteen tulos – manuaalitulokset) vaihtelu pyökin substraattilla.

### 6.3 Suhteellinen keskihajonta

Suhteellinen keskihajonta laskettiin erikseen jokaiselle kannalle laitteen sekä manuaalimenetelmän tuloksista. Suhteellinen keskihajonta on laskettu jakamalla keskihajonta keskiarvolla ja saatu luku on ilmoitettu prosentteina. Alla olevasta taulukosta nähdään, että laitteen antamien tuloksien keskihajonta on lähes aina pienempi kuin manuaalitulosten. Poistamalla niin sanotut outlierit, laitteen antamien tulosten suhteellinen keskihajonta on kaikissa tapauksissa pienempi. Pienemmällä suhteellisella keskihajonnalla voidaan perustella analyysimenetelmän siirtämistä robotille.



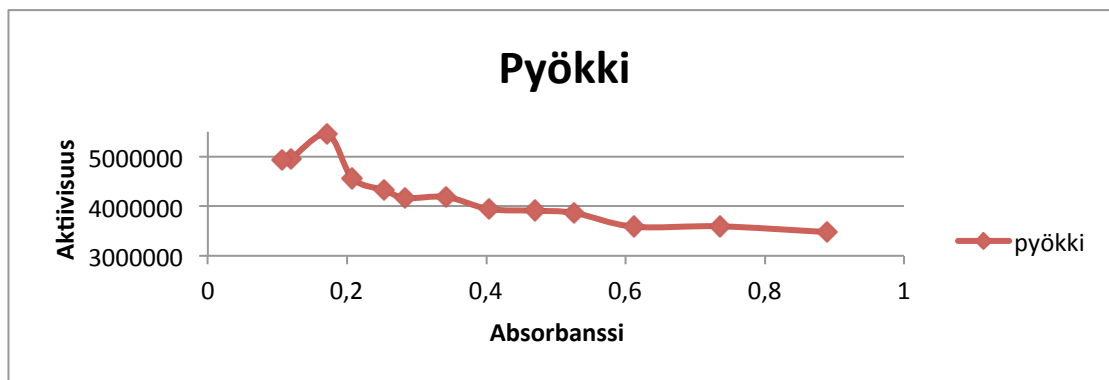
Taulukko 3. Aktiivisuustulosten suhteelliset keskihajonnat koivun substraattilla.

**Koivu**

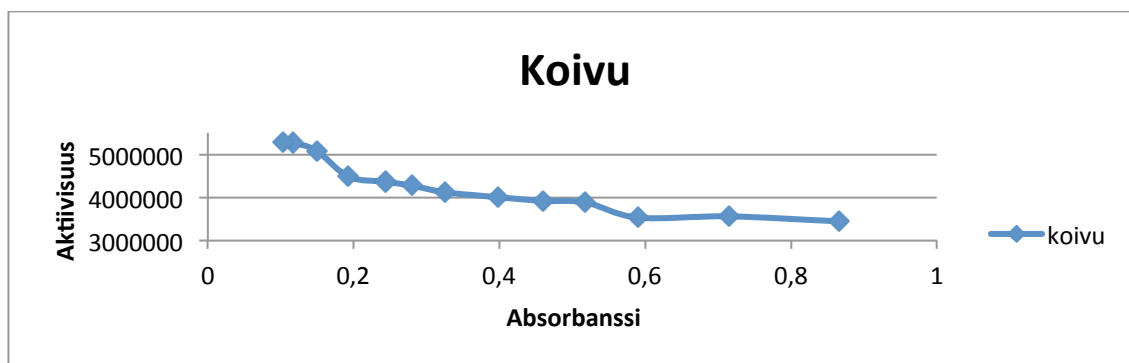
<b>Puolivalmiste</b>	<b>RSD % (manuaali)</b>	<b>RSD % (laite)</b>
ABJP	6,38	9,55
ACLP	4,07	3,98
AHHP	7,53	3,15
AHKP	7,62	6,85
XYL1	6,67	6,55
XYL2	4,91	4,91
RXAP	7,06	5,40
RXKP	7,91	4,67
RXMP	9,12	5,43

**6.4 Lineaarinen mittausalue**

Menetelmän lineaarisella mittausalueella tarkoitetaan tässä työssä absorbanssialuetta, jolla mittaustulokset pysyvät likimain samoina. Laimennokset näytteistä tehtiin niin, että spektrofotometrillä mitattaessa absorbanssi saatiin osumaan kyseiselle alueelle. Ksylanaasiaktiivisuuden määrittämenetelmän lineaarisuusalue oli tiedossa, mutta sitä tarkasteltiin vielä laitteen tulosten osalta mahdollisten poikkeamien havaitsemiseksi. Testaus suoritettiin tekemällä yhdestä puolivalmisteesta laajan absorbanssialueen kattava laimennossarja, joista kaikista analyysi suoritettiin yhdellä kertaa. Lineaarisen mittausalueen todettiin olevan lähes sama kuin manuaalimenetelmässä, jossa se on välillä 0,2–0,4. Samalla laimennoksella saadaan kuitenkin hieman korkeampia absorbanssiarvoja laitteella kuin käsin. Laitteen mittausalueen absorbanssirajoiksi valittiin 0,25–0,5. Tällä alueella tulosten ero pysyy n. 10 % sisällä. Lineaariset mittausalueet olivat myös samat eri substraattien osalta, kuten kuvista 8 ja 9 nähdään.



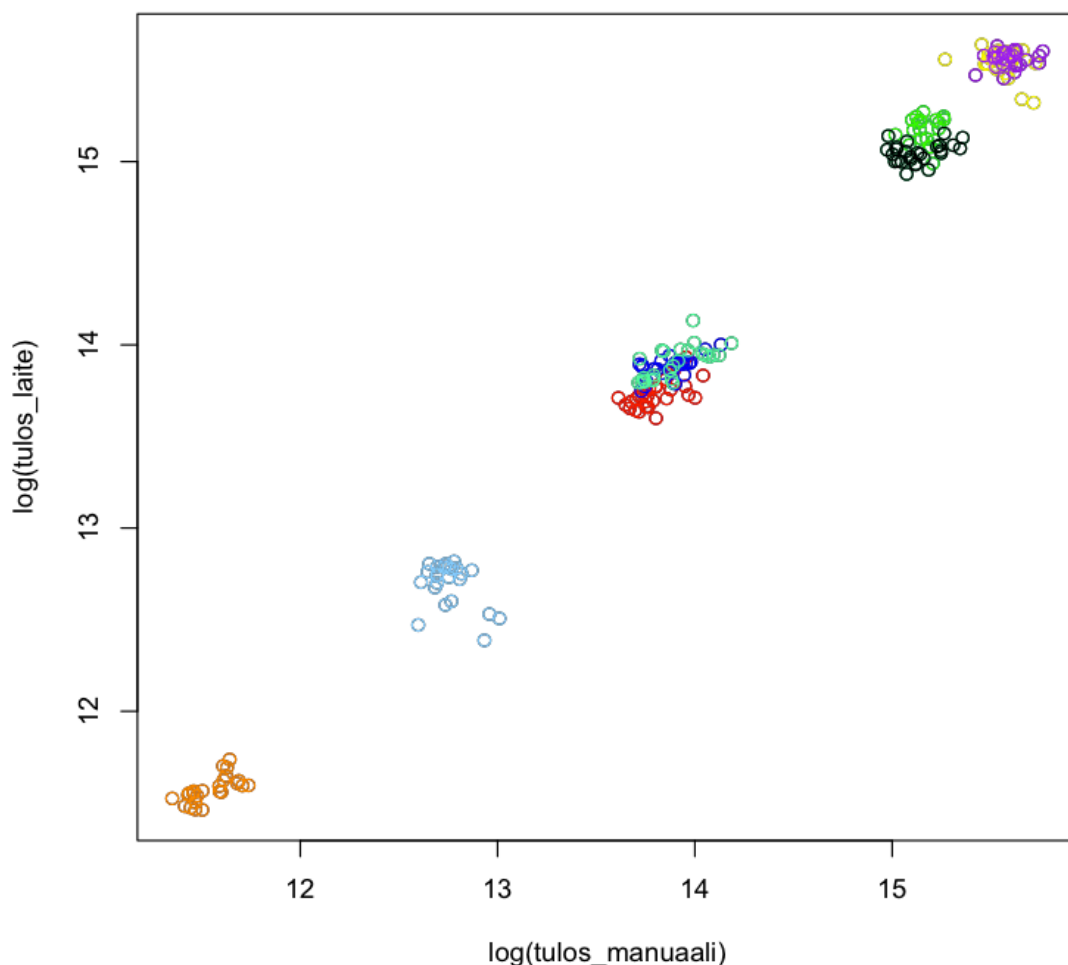
Kuva 8. Mittausalueen testaus pyökin ksylaanilla.



Kuva 9. Mittausalueen testaus koivun ksylaanilla.

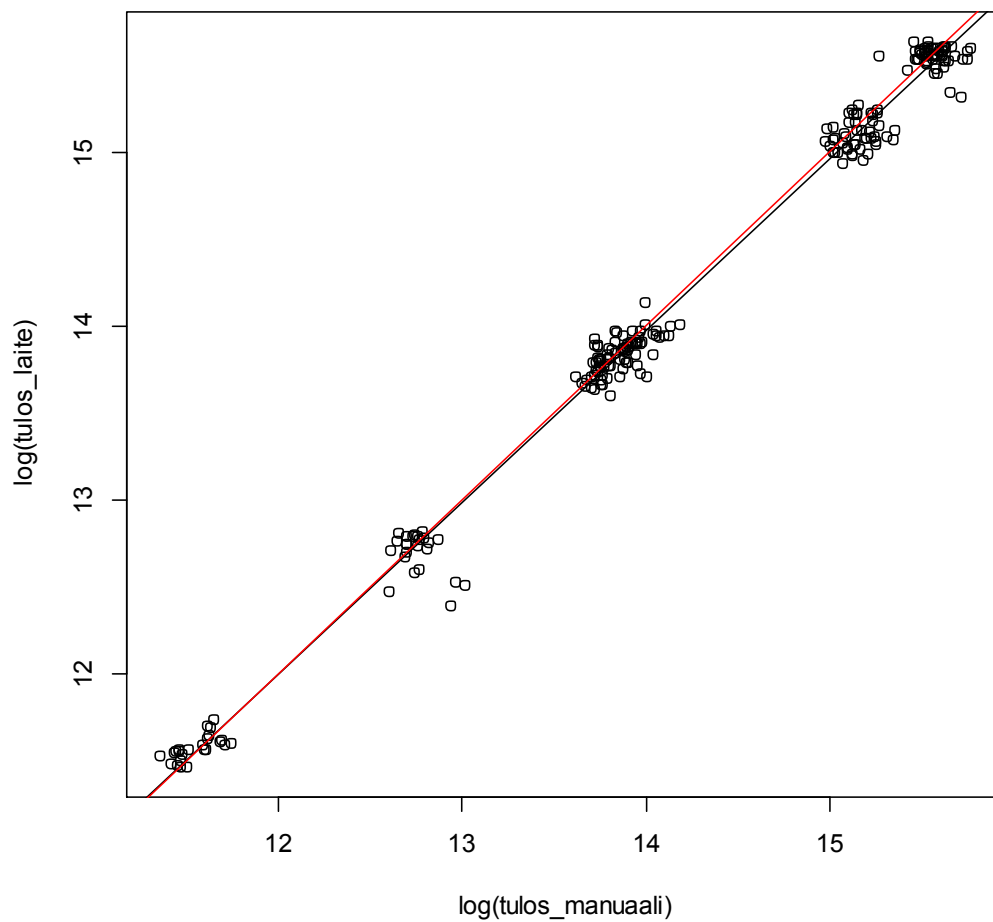
## 6.5 Riippuvuus

Aktiivisuustuloksia oli välillä mielekäästä tarkastella logaritmeina, sillä eri näytteiden aktiivisuustasot erosivat hyvin paljon toisistaan, ja siksi tulokset vaihtelivat tuhansista miljooniin. Ottamalla luonnollinen logaritmi tuloksista, saatiin niitä käsiteltyä järkevämmiin. Kuvassa 10 on havainnollistettu eri puolivalmisteiden tulosten sijoittumista väreillä.



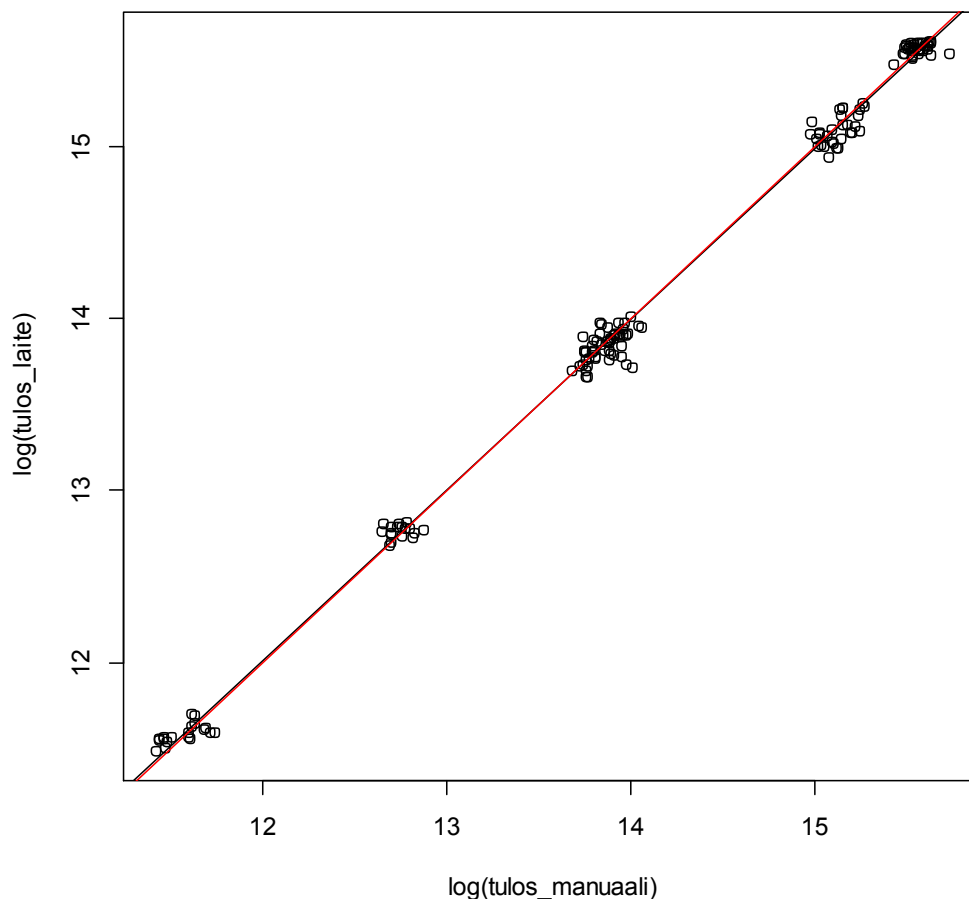
Kuva 10. Laitteen ja manuaalimenetelmän tulosten logaritmit. Eri puolivalmisteet on merkitty eri väreillä, värit alhaalta ylös: ACLP=oranssi, ABJP=vaalean sininen, XYL1=punainen, RXMP=tumman sininen, RXAP=turkoosi, RXKP=musta, AHHP=kirkkaan vihreä, AHKP=keltainen ja XYL2=purppura.

Kuvassa 11 on piirretty R-ohjelmalla laitteen antamien tulosten riippuvuus manuaalitestauksen tuloksiin verrattuna. Mukana on kaikki mittaukset sekä koivulla että pyökillä ja yksittäisiä ns. outliereita on havaittavissa. Musta suora on sovitettu tulosten kautta ja punainen suora kulmakertoimella 1 on piirretty vertailuksi. Kuvasta nähdään, että suorat kulkevat hyvin lähellä toisiaan. Kuvassa ei ole havaittavissa selkeää eroa tulosten välillä. Eri aktiivisuustasoja on kuvan perusteella selkeästi viisi. Mustalla piirretyn sovitettun suoran kulmakerroin on 0,98825 ja leikkauspiste 0,14113 sekä selitysaste 0,9918.



Kuva 11. Laitteen ja manuaalimenetelmän tulosten logaritmit sekä niihin sovitettu suora (musta).

Kuvassa 12 on piirretty myös laitteen ja manuaalimenetelmän tulosten riippuvuus, mutta ns. outlierit on poistettu. Nähdään, että musta ja punainen suora ovat likimain päällekkäin. Mustan sovitetun suoran kulmakerroin on nyt 0,99210 ja leikkauspiste 0,10582 sekä selitysaste 0,9966. R-ohjelmalla tehtiin molemmille suorille regressioanalyysi, jonka perusteella leikkauspiste ei ollut merkitsevä kummassakaan tapauksessa ( $p > 0,05$ ), joten suoran voisi sovittaa kulkemaan origon kautta.



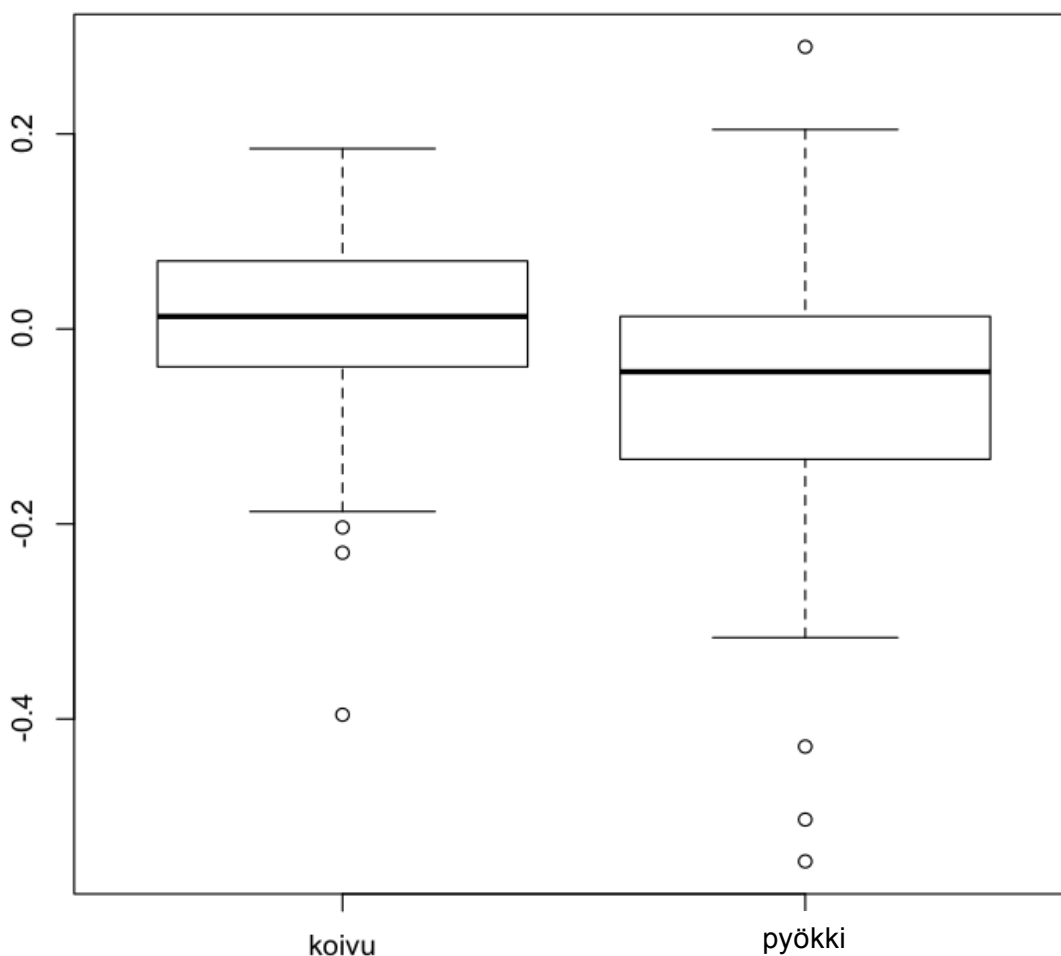
Kuva 12. Laitteen ja manuaalimenetelmän tulosten logaritmit ja niihin sovitettu suora (musta), kun datasta poistettiin ns. outlierit. Punaisella piirretty vertailuksi suora, jonka kulmakerroin on 1.

## 6.6 Kaksisuuntainen varianssianalyysi (ANOVA)

Varianssianalyysiä käytetään, kun halutaan tutkia, onko kahden tai useamman ryhmän keskiarvoissa tilastollisesti merkitsevää eroa (Holmes ym. 2006:194-195). ANOVA tarkastelee datassa esiintyvää vaihtelua vertailemalla ryhmien sisäistä ja ryhmien välistä vaihtelua. Kaksisuuntainen ANOVA sisältää kaksi selittävää muuttujaa ja yhden selitettävän muuttujan. Tällöin tarkastellaan selittävien muuttujien vaikutusta selitettävän muuttujan arvoihin yksittäin sekä mahdollista yhdysvaikutusta. (Varianssianalyysi 2013.)

Tässä tapauksessa kaksisuuntaisella ANOVAlla testattiin substraatin ja puolivalmisteen vaikutusta tulosten erotusten keskiarvoihin. Erotus on siis manuaalitulokset vähennettynä laitteen tuloksista. Mikäli erotus olisi nolla, tulokset olisivat samat sekä laitteella että käsin tehtäessä. Tuloksia tarkasteltiin logaritmeina.

Sekä substraatilla että puolivalmisteella näytti olevan vaikutusta tulosten erotusten keskiarvoihin. Erotusten keskiarvot koivun substraatilla erosivat testin mukaan pyökillä tehdyistä. Eri puolivalmisteiden välillä oli myös tilastollisesti merkitsevä ero keskiarvoissa. Sen sijaan substraatin ja puolivalmisteen välillä ei ollut yhdysvaikutusta. Kaikkien mittaustulosten erotukset koivulla ja pyökillä on havainnollistettu kuvassa 13. Pyökillä tehtäessä tuloksissa näyttää olevan suurempi hajonta. Kun poikkeavat mittaustulokset poistetaan, hajontakin pienenee pyökin osalta. ANOVAn perusteella siis nollahypoteesi tulisi hylätä. R-ohjelman tulosteet liitteessä 2.



Kuva 13. Tulosten logaritmien erotukset (laite-manuaali) koivulla ja pyökillä. Paksu musta viiva laatikon keskellä kuvaa mediaania. Laatikon reunat ovat ala- ja yläneljännekset. Ympyrät ovat poikkeavia arvoja. Viiksien päät vastaavat pienintä ja suurinta arvoa, kun poikkeavia arvoja ei oteta mukaan.

## 6.7 Tukeyn testi

Jos ANOVAlla on saatu tilastollisia merkitsevyyksiä, eli sen mukaan ryhmien välillä on eroja, käytetään ryhmäkeskiarvojen parittaiseen vertailuun siihen tarkoitettuja testejä. Tukeyn testiä (Tukey HSD, honestly significant difference) pidetään usein yleispätevänä, sillä se ottaa huomioon myös koko aineiston hajonnan. (Karjalainen 2010:233.) Jos yhdysvaikutus termi on tilastollisesti merkitsevä, on vaikeaa tehdä johtopäätöksiä Tukeyn testin perusteella, sillä yhdysvaikutus sekoittaa eroja parien keskiarvoissa. Yhdysvaikutus ei kuitenkaan ollut merkitsevä tässä tapauksessa. Tukeyn testi antaa mahdollisuuden tehdä paljon tarkempia tulkintoja datasta, koska sillä voidaan vertailla

tiettyjä näytteitä pareittain ja löytää ne, jotka aiheuttavat merkitseviä eroja ANOVAssa. (Holmes ym. 2006:210-211.)

Tukeyn testi tehtiin R-ohjelmalla ja luottamustasoksi valittiin 95 %. Testin perusteella pyökin ja koivun substraateilla tulosten erotusten keskiarvot poikkeavat tilastollisesti merkitsevästi toisistaan, sillä p-arvo oli vain n. 0,0006. Myös eri puolivalmisteiden välillä oli ANOVAn mukaan merkitsevä ero, ja Tukeyn testi näyttikin eron aiheutuvan lähinnä XYL1-puolivalmisteesta. Sen keskiarvo poikkesi merkitsevästi neljään puolivalmisteseen verrattaessa, joita olivat ACLP, AHKP, ABJP sekä RXAP. R-ohjelman tulosteet liitteessä 3.

Substraatin ja puolivalmisteen välillä ei ollut yhdysvaikutusta ANOVAn mukaan, ja tämä oli havaittavissa myös Tukeyn testin perusteella. Substraatti ei vaikuta tuloksiin eritavalla tietyn puolivalmisteen kanssa.

## 6.8 Parittainen t-testi

Parittaisella t-testillä testataan, poikkeavatko kahden ryhmän keskiarvot toisistaan otosten ollessa parittaisia (Karjalainen 2010:230). Koejärjestely oli parittainen, sillä samat näytteet analysoitiin samana päivänä sekä laitteella että käsin ja molemmilla substraateilla. Laitteen antamien ja manuaalimenetelmän tulosten keskiarvoja verrattiin toisiinsa parittaisella t-testillä Excelissä erikseen koivun sekä pyökin osalta. Taulukoissa 4 ja 5 on esitetty t-testin antamat p-arvot.



Taulukko 4. T-testin p-arvot koivun substraattilla, merkitsevyystaso 0,05.

<b>Puolivalmiste</b>	<b>p-arvo</b>
ABJP	0,951601
<b>ACLP</b>	<b>0,001886</b>
<b>AHHP</b>	<b>0,029681</b>
AHKP	0,679271
<b>XYL1</b>	<b>0,030259</b>
XYL2	0,334567
RXAP	0,150795
RXKP	0,050807
RXMP	0,147078

Taulukoista nähdään, että merkitsevyystasolla 0,05 muutama p-arvo on tilastollisesti merkitsevä koivun substraattilla ja yksi pyökin substraattilla.

Taulukko 5. T-testin p-arvot pyökin substraattilla, merkitsevyystaso 0,05.

<b>Puolivalmiste</b>	<b>p-arvo</b>
ABJP	0,113858
ACLP	0,540816
AHHP	0,134680
AHKP	0,414207
<b>XYL1</b>	<b>0,002154</b>
XYL2	0,116291
RXAP	0,451100
RXKP	0,176464
RXMP	0,072219

Kun tarkastellaan jokaista testattua puolivalmistetta erikseen laitteen ja manuaalitulos-ten osalta, niin koivuksylaania käytettäessä käsintehtyjen tulosten ja manuaalitulosten keskiarvoissa on tilastollisesti merkitsevä ero ACLP-, AHHP- ja XYL1-puolivalmisteiden kohdalla. Pyökkisubstraattilla tilastollinen ero on vain XYL1- puolivalmisteen kohdalla. Käytännössä ero keskiarvoissa saman puolivalmisteen kohdalla ei ole kovin suuri ja jää

sallitun vaihtelun sisään. Laite antaa keskimäärin hieman matalampaa tulosta pyökillä kuin manuaalimenetelmä, kuten aiemmin todettiin.

## 7 Yhteenveto

Tässä opinnäytetyössä otettiin käyttöön ksylanaasiaktiivisuuden määritysmenetelmä Tecan Freedom EVO -nesteenkäsittelyrobotilla sekä testattiin pyökin ksylaaniin soveltuvuutta substraatiksi koivun tilalle. Testit tehtiin kaikille puolivalmisteille sekä käsin että laitteella käyttäen BXU-ksylanaasimenetelmää ja laitteen antamia tuloksia verrattiin manuaalimenetelmän tuloksiin. Tuloksia käsiteltiin sekä R-ohjelmalla että Excelillä.

Nesteenkäsittelyrobotin todettiin tilastollisten testien jälkeen soveltuvan analyysiin ja antavan käytännössä samanlaisia tuloksia kuin manuaalimenetelmä. Parittaisella t-testillä verrattiin laitteen ja manuaalimenetelmän tuloksien keskiarvoja toisiinsa jokaiselle puolivalmisteelle erikseen molempien substraattien osalta. Testin mukaan tulosten keskiarvoilla ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa kuin kolmen puolivalmisteen kohdalla koivun substraatilla ja yhdellä pyökin substraatilla. Näiden puolivalmisteiden kohdalla voisi vielä tehdä lisää testejä. Kuitenkaan merkitsevyystaso 0,05 ei tässä tapauksessa ole ehdoton, sillä tuloksissa sallitaan jonkin verran vaihtelua. Lisäksi koivun ksylaaniin käyttö loppuu pian, joten on välttämätöntä keskittyä pyökin ksylaaniin.

Pyökin ksylaaniin soveltuvuudesta korvaavaksi substraatiksi oli jo tehty aikaisemmin testejä manuaalimenetelmällä positiivisin tuloksin. Tämän työn testeissä havaittiin myös, että koivun substraatin korvaaminen on mahdollista kyseisellä pyökin ksylaanilla, vaikka hajonta näytti olevan hieman suurempaa. Eroja substraattien välillä oli sameudessa, säilyvyydessä sekä värissä keittämisen jälkeen. Kaksisuuntaisella varianssianalyysillä testattiin substraatin ja puolivalmisteen vaikutusta tulosten erotusten keskiarvoihin. Erotus oli siis tässä tapauksessa manuaalimenetelmän tulokset vähennettynä laitteen tuloksista, koska manuaalimenetelmä toimi referenssinä. Eri puolivalmisteilla näytti olevan vaikutus erotuksiin, samoin eri substraateilla, mutta yhdysvaikutusta substraatin ja puolivalmisteen välillä ei ollut. ANOVAn tulosten jälkeen Tukeyn testillä etsittiin, mitkä aiheuttavat merkitsevät erot ANOVAssa. Näytti siltä, että puolivalmisteiden tilastollisesti merkitsevän vaikutuksen tulosten keskiarvojen erotukseen aiheutti lähinnä yksi puolivalmisteista. Mikä aiheuttaa eron juuri kyseisen XYL1 -puolivalmisteen kohdalla, jää tarkasteltavaksi tämän työn ulkopuolella. Käytännössä tuloksien keskiarvojen ero ei

ole merkitsevä, sillä tuloksissa sallitaan tietty vaihtelu. Myös substraattien erot ovat käytännössä hyväksyttävällä tasolla.

## Lähteet

ABVista. 2013. <<http://www.abvista.com/products/enzymes/xylanase>> Luettu 1.3.2013

Baking xylanases. www-sivu. <<http://www.abenzymes.com/products/baking/dough-and-volume>> luettu 4.5.2013

Biocyclopedia 2014.

<[http://www.eplantscience.com/index/biotechnology\\_methods/biochemistry/estimation\\_of\\_reducing\\_sugars\\_by\\_the\\_dinitro\\_salicylic\\_acid\\_dns\\_method.php](http://www.eplantscience.com/index/biotechnology_methods/biochemistry/estimation_of_reducing_sugars_by_the_dinitro_salicylic_acid_dns_method.php)> Luettu 24.3.2014

Buchert J., Tenkanen M., Kantelinen A., Viikari L. Application of xylanases in the pulp and paper industry. 1994. Volume 50, Issue 1, Pages 65-72. Verkkojulkaisu.

Butt M.S. et al.: Xylanases in Baking Industry, Food Technol. Biotechnol. 46 (1) 22-31 (2008) Verkkodokumentti.

<[http://scholar.google.com/scholar\\_url%3Fhl%3Dfi%26q%3Dhttp://hrcak.srce.hr/file/34864%26sa%3DX%26scsig%3DAAGBfm1XP6dnYYNfSbQfBHSMh1UIaU-CQ%26oi%3Dscholarr&rct=j&sa=X&ei=s8GDUUpqzA9Db4QJSJuoCICw&ved=0CCcQgAMoA-DAA&q=M.S.+BUTT+et+al.:+Xylanases+in+Baking+Industry,+Food+Technol.+Biotechnol.+46+\(1\)+22-31+\(2008\)&usg=AFQjCNHyTGld-t9J43fRC3-D9sgX7eE8mQ](http://scholar.google.com/scholar_url%3Fhl%3Dfi%26q%3Dhttp://hrcak.srce.hr/file/34864%26sa%3DX%26scsig%3DAAGBfm1XP6dnYYNfSbQfBHSMh1UIaU-CQ%26oi%3Dscholarr&rct=j&sa=X&ei=s8GDUUpqzA9Db4QJSJuoCICw&ved=0CCcQgAMoA-DAA&q=M.S.+BUTT+et+al.:+Xylanases+in+Baking+Industry,+Food+Technol.+Biotechnol.+46+(1)+22-31+(2008)&usg=AFQjCNHyTGld-t9J43fRC3-D9sgX7eE8mQ)> Luettu 4.5.2013.

Enzymatic deconstruction of xylan 2013.

<<http://biofueloutlook.blogspot.co.uk/2010/09/enzymatic-deconstruction-of-xylan-for.html>> Luettu 1.3.2013.

Frank A. Settle, Editor. 1997. Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. New Jersey: Prentice Hall PTR.

Hawkins, D. 2005. Biomeasurement. New York: Oxford University Press Inc.

Holmes D., Moody P., Dine D. 2006. Research methods for the biosciences. New York: Oxford University Press Inc.

Jaarinen S., Niiranen J. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. Helsinki: Edita Prima Oy.

Karjalainen L. 2010. Tilastotieteen perusteet. Keuruu: Otavan Kirjapaino Oy.

Lever, M. 1972. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. Analytical Biochemistry vol 47, s. 273-279.

Miller G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, vol 31, s.426-428.

Polaina J., MacCabe A., Editors. 2007. Industrial Enzymes: Structure, function and applications. Dordrecht: Springer.

Sadasivam S., Manickam A. 1996. Biochemical Methods. First ed. 1996, Reprint 2005. New Delhi: New Age International (P) Ltd.

Sigma 2013.

<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/x4252?lang=en&region=GB>>  
Luettu 3.8.2013

Taavitsainen VM. 2010. Tilastomatematiikan peruskurssi. Verkkodokumentti.

<[http://users.metropolia.fi/~velimt/TilMat/tilmatpk\\_with\\_R.pdf](http://users.metropolia.fi/~velimt/TilMat/tilmatpk_with_R.pdf)>

Tecan Schweiz AG. 2001. Liquid Handling guide. Doc. No. 391 7890 V1.0. Switzerland: TECAN Schweiz AG.

Tecan 2013.

<<http://www.tecan.com/platform/apps/product/index.asp?MenuID=2694&ID=5270&Menu=1&Item=21.1.8>> Luettu 1.3.2013

Työterveyslaitos 2009. Verkkodokumentti.

<[http://www.ttl.fi/fi/ergonomia/ergonomia\\_eri\\_aloille/laboratoriotyo/pipetointi/Documents/Loppuraportti\\_Pipetti2009.pdf](http://www.ttl.fi/fi/ergonomia/ergonomia_eri_aloille/laboratoriotyo/pipetointi/Documents/Loppuraportti_Pipetti2009.pdf)> Luettu 28.4.2014.

Varianssianalyysi. www-sivu.

<<http://www.fsd.uta.fi/menetelmaopetus/varianssi/anova.html>> Luettu 12.11.2013.

Xylanase activity assay. IUPAC 1987. Verkkodokumentti.

<<http://www.scribd.com/doc/12879277/Xylanase-Activity-Assay-IUPAC>> Luettu 1.10.2013

ANALYTICAL METHOD      Assay of xylanase activity

8.3.2014

B038-I

Miia Saaristo

1(5)



## ASSAY OF XYLANASE ACTIVITY

### Principle

Xylanase in the sample hydrolyses the substrate, beech xylan, and the amount of released reducing carbohydrates is determined spectrophotometrically using dinitrosalicylic acid.

### Unit of activity

One xylanase unit (BXU) is defined as the amount of enzyme that produces reducing carbohydrates having a reducing power corresponding to one nmol xylose from beech xylan in one second under the assay conditions (1 BXU = 1 nkat).

### Field of application

The method is suitable for measurement of enzyme samples containing xylanase. The linearity of the assay should be checked before measurements are done.

### Safety

DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) is harmful if swallowed and causes skin and respiratory irritation. Citric acid causes serious eye irritation. NaOH (sodium hydroxide) causes severe skin burns and eye damage. Avoid breathing dust and aerosols. Avoid contact with skin and eyes. Wear protective clothing, gloves, glasses and a respirator if required. Use a fume cupboard or local exhaust ventilator to weigh hazardous chemicals.

ANALYTICAL METHOD Assay of xylanase activity



8.3.2014

B038-I

Miia Saaristo

2(5)

### Assay conditions

Substrate	beech xylan
pH	5.3
Temperature	50 °C ± 0.5 °C
Incubation time	5 min

### Equipment

Water bath	50 °C
Water bath	100 °C
Test tube mixer (vortex)	
Spectrophotometer	540 nm
or option	
Liquid handling robot (Tecan Freedom EVO or equivalent)	
Microplate reader (Tecan Infinite M200 or equivalent)	

### Reagents

All solutions are prepared in deionized water, Milli-Q or equivalent.

#### 1. Sodium Citrate buffer (0.05 M, pH 5.3)

Dissolve 10.5 g of citric acid ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ , Merck 100244) in about 800 ml of water and adjust the pH with 1 M NaOH to 5.3 (the consumption should be about 110 ml). Make up to 1000 ml with water in a volumetric flask.

**Note:** Into the buffers which are used for premix samples add 20 g EDTA (disodium salt, Titriplex III, Merck 108418) before adjusting the pH and make up to 1000 ml in water.

#### 2. Substrate - 1 % beech xylan.

Homogenize 1.0 g of xylan (from beechwood, Sigma X-4252) by adding the powder gradually in about 80 ml of citrate buffer heated to 60 °C using a kitchen blender or magnetic stirrer. Heat to boiling point on a heat-

ANALYTICAL METHOD Assay of xylanase activity



8.3.2014

B038-I

Miia Saaristo

3(5)

ing magnetic stirrer. Cool with continued stirring, cover and stir slowly overnight at room temperature. Make the volume up to 100 ml with the citrate buffer. If the solution is not clear centrifuge (e.g. Sorvall GSA, 8000 rpm, 20 min.) it to remove the precipitate. Store at + 4 °C for a maximum of 1 week or freeze in aliquots at –20 °C. Mix well after thawing.

### 3. DNS reagent

Dissolve 50.0 g of 3,5-dinitrosalicylic acid (Sigma D-0550) in about 4 l of water. With continuous magnetic stirring, gradually add 80.0 g of NaOH and let it dissolve. Add 1500 g of Rochelle Salt (K-Na-tartrate, Merck 108087) in small portions with continuous stirring. The solution may be cautiously warmed to a maximum temperature of 45 °C. Cool to room temperature and make up to 5000 ml with water in a volumetric flask. If the solution is not clear, filter through Whatman No. 1 filter paper. Store in a dark bottle at room temperature.

## Sample preparation

Liquid enzymes: Weigh approximately 0.25 g - 0.5 g of enzyme liquid accurately in 25 ml volumetric flask, fill the flask up to the mark by citrate buffer and mix properly.

Dry enzymes: Weigh approximately 0.5 g - 1 g enzyme accurately in 50 ml volumetric flask, fill the flask up to the mark by citrate buffer and stir on a magnetic plate for 20-30 minutes at room temperature. Sample size is recommended to be increased to 2.5 g (in 100 ml) if the sample is inhomogenous or high in bulk density (> 1kg/l). When needed centrifuge for 10 minutes at ca. 2800 x g.

Vitamin/mineral premixes: Weight approximately 5 g of enzyme-containing premix accurately in 100 ml beaker and add 40 ml citrate buffer containing 2% (w/v) EDTA. Stir samples for 30 minutes on a magnetic stirrer plate at room temperature and centrifuge for 10 minutes at ca. 2800 x g.

The sample is diluted in citrate buffer. A suitable dilution will yield an absorbance difference of 0.1 – 0.4 (*Trichoderma*) or 0.2 – 0.4 (*Bacillus*, *Aspergillus*). Using liquid handling robot the absorbance difference should be between 0.25 - 0.5.



ANALYTICAL METHOD Assay of xylanase activity



8.3.2014

B038-I

Miia Saaristo

4(5)

## Assay

### Manual method:

Add 1.8 ml of substrate solution to each of two test tubes and equilibrate at 50 °C for 5 minutes. Add 200 µl of diluted enzyme solution to one of the tubes and mix with a vortex mixer. Enzyme blanks don't need to incubate. After exactly 5 minutes, add 3.0 ml of DNS reagent to both tubes, mix and remove the tubes from the water bath. Add 200 µl of sample solution to the enzyme blank tubes. Place the tubes in a boiling water bath one at a time. After boiling for exactly 5 minutes remove the tubes and cool in cold water to room temperature. Measure the sample absorbance against the enzyme blank at 540 nm. Read the activity from the standard line and multiply by the dilution factor.

### Liquid handling robot:

Work in accordance with the instructions of Tecan Freedom EVO

## Standard

Prepare a 10 mM xylose stock solution. Dissolve 150 mg of xylose <sup>1.)</sup>(Merck 108689) in citrate buffer and make up to 100 ml with buffer in a volumetric flask. Stock solution can be frozen in small aliquots at - 20 °C; after thawing the tubes must be carefully mixed. The stock solution is diluted in buffer as follows:

Dilution	Xylose	<sup>2.)</sup> BXU/ml
	µmol/ml	
1:1	10.0	33.3
1:2	5.0	16.7
1:3	3.33	11.0
1:5	2.0	6.7

<sup>1.)</sup> Store in a desiccator.

<sup>2.)</sup> The xylanase activity (BXU/ml) is obtained by multiplying the xylose concentration (µmol/ml) by 1000 and dividing by the reaction time (300 s).

Standard solutions can be frozen in small aliquots at -20 °C. Do duplicate assays of each standard dilution in the same way as the enzyme blanks: pipette into test tubes 1.8 ml of substrate, add 3.0 ml of DNS

ANALYTICAL METHOD Assay of xylanase activity



8.3.2014

B038-I

Miia Saaristo

5(5)

and 200 µl of standard dilution. Prepare the reagent blank by adding 200 µl of citrate buffer instead of the standard dilution. Boil the tubes exactly 5 minutes, cool and measure the absorbances against the reagent blank at 540 nm. Construct a standard line for every series of assays.

### Calculation

Subtract the blank absorbance from the sample absorbance. Read the activity (BXU/ml) from the standard curve. Multiply it by the dilution factor. The final calculated activity is represented in xylanase units per gram of original sample (BXU/g). Calculations (in BXU) are presented below

$$\text{BXU/g} = \frac{\text{BXU/ml} \times \text{volume of extraction buffer (ml)} \times \text{dilution factor}}{\text{weight of sample extracted (g)}}$$

where:

<i>BXU/ml</i>	= activity of the unknown sample (from standard curve)
<i>Vol of extraction buffer</i>	= 25 ml/50 ml for enzymes and 40 ml for premixtures
<i>Dilution factor</i>	= total dilution factor
<i>Weight of sample extracted</i>	= appr. 0.25 g - 1.0 g for enzyme preparations and appr. 5 g for premixtures

### Reference

Bailey, M.J. and Poutanen, K. (1989). Production of xylanases by strains of Aspergillus. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30:5-10

#R-ohjelmassa käytetty sana kanta tarkoittaa puolivalmistetta.

#kaikki mittaustulokset

```
> summary(aov(log(tulos_laite)-log(tulos_manuaali)~substraatti*kanta))
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
substraatti	1	0.2681	0.26805	23.165	2.82e-06 ***
kanta	8	0.3319	0.04149	3.585	0.000633 ***
substraatti:kanta	8	0.0377	0.00471	0.407	0.915874
Residuals	212	2.4532	0.01157		

#outlierit poistettu (ero yli 10 %)

```
> summary(aov(log(tulos_laite)-log(tulos_manuaali)~substraatti*kanta))
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
substraatti	1	0.0574	0.05741	12.323	0.000607 ***
kanta	8	0.1359	0.01698	3.645	0.000710 ***
substraatti:kanta	8	0.0673	0.00842	1.807	0.080831 .
Residuals	136	0.6336	0.00466		

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

#R-ohjelmassa käytetty sana kanta tarkoittaa puolivalmistetta.

#Yhdysvaikutus jätetty pois tulosteesta, ei ollut merkitsevä.

```
> TukeyHSD(fm1,ordered=TRUE)
```

Tukey multiple comparisons of means

95% family-wise confidence level

factor levels have been ordered

Fit: aov(formula = log(tulos\_laite) - log(tulos\_manuaali) ~ substraatti + kanta)

substraatti	diff	lwr	upr	p adj
koivu-pyökki	0.03882619	0.01695375	0.06069863	0.0006074

kanta

	diff	lwr	upr	p adj
RXKP-XYL1	0.0329729767	-0.0400361726	0.10598213	0.8868288
RXMP-XYL1	0.0679108236	-0.0028622190	0.13868387	0.0708320
XYL2-XYL1	0.0709264139	-0.0009075856	0.14276041	0.0558575
RXAP-XYL1	0.0732107754	0.0013767760	0.14504477	0.0421242
AHHP-XYL1	0.0744626237	-0.0013246369	0.15024988	0.0582536
AHKP-XYL1	0.0833831403	0.0115491409	0.15521714	0.0105578
ACLP-XYL1	0.0935103697	0.0237002705	0.16332047	0.0014178
ABJP-XYL1	0.0938981925	0.0220641930	0.16573219	0.0020790
RXMP-RXKP	0.0349378469	-0.0389925899	0.10886828	0.8585204
XYL2-RXKP	0.0379534372	-0.0369932733	0.11290015	0.8052460
RXAP-RXKP	0.0402377987	-0.0347089118	0.11518451	0.7501157
AHHP-RXKP	0.0414896470	-0.0372542087	0.12023350	0.7688544
AHKP-RXKP	0.0504101637	-0.0245365468	0.12535687	0.4640380
ACLP-RXKP	0.0605373930	-0.0124717564	0.13354654	0.1906551
ABJP-RXKP	0.0609252158	-0.0140214947	0.13587193	0.2124633
XYL2-RXMP	0.0030155903	-0.0697545759	0.07578576	1.0000000
RXAP-RXMP	0.0052999518	-0.0674702144	0.07807012	0.9999998
AHHP-RXMP	0.0065518001	-0.0701233751	0.08322698	0.9999991
AHKP-RXMP	0.0154723167	-0.0572978494	0.08824248	0.9990649
ACLP-RXMP	0.0255995460	-0.0451734966	0.09637259	0.9668818
ABJP-RXMP	0.0259873689	-0.0467827973	0.09875754	0.9693308
RXAP-XYL2	0.0022843615	-0.0715180572	0.07608678	1.0000000
AHHP-XYL2	0.0035362098	-0.0741193270	0.08119175	1.0000000
AHKP-XYL2	0.0124567265	-0.0613456922	0.08625915	0.9998305
ACLP-XYL2	0.0225839558	-0.0492500437	0.09441796	0.9861506
ABJP-XYL2	0.0229717786	-0.0508306401	0.09677420	0.9870163
AHHP-RXAP	0.0012518483	-0.0764036886	0.07890739	1.0000000
AHKP-RXAP	0.0101723649	-0.0636300537	0.08397478	0.9999637
ACLP-RXAP	0.0202995943	-0.0515344052	0.09213359	0.9931346
ABJP-RXAP	0.0206874171	-0.0531150016	0.09448984	0.9934990
AHKP-AHHP	0.0089205167	-0.0687350201	0.08657605	0.9999911
ACLP-AHHP	0.0190477460	-0.0567395146	0.09483501	0.9969237
ABJP-AHHP	0.0194355688	-0.0582199680	0.09709111	0.9970125
ACLP-AHKP	0.0101272293	-0.0617067701	0.08196123	0.9999568
ABJP-AHKP	0.0105150521	-0.0632873666	0.08431747	0.9999532
ABJP-ACLP	0.0003878228	-0.0714461766	0.07222182	1.0000000

#Kuva 11.

Call:

lm(formula = log(tulos\_laite) ~ log(tulos\_manuaali))

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.53518	-0.06736	0.01512	0.07698	0.32755

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	0.14113	0.08481	1.664	0.0975 .
log(tulos_manuaali)	0.98825	0.00596	165.810	<2e-16 ***

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

#Kuva 12.

Call:

lm(formula = log(tulos\_laite) ~ log(tulos\_manuaali))

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.285610	-0.038919	0.001786	0.053370	0.172238

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	0.10582	0.06684	1.583	0.115
log(tulos_manuaali)	0.99210	0.00473	209.760	<2e-16 ***

---